



(19)

(11) Publication number:

07103959 A

Generated Document.

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(21) Application number: 05249335

(51) Int'l. Cl.: G01N 30/86

(22) Application date: 05.10.93

(30) Priority:

(43) Date of application
publication: 21.04.95

(84) Designated contracting
states:

(71) Applicant: HITACHI LTD

(72) Inventor: ITO MASATO
DEGUCHI KISABURO
MIURA JUNKICHI

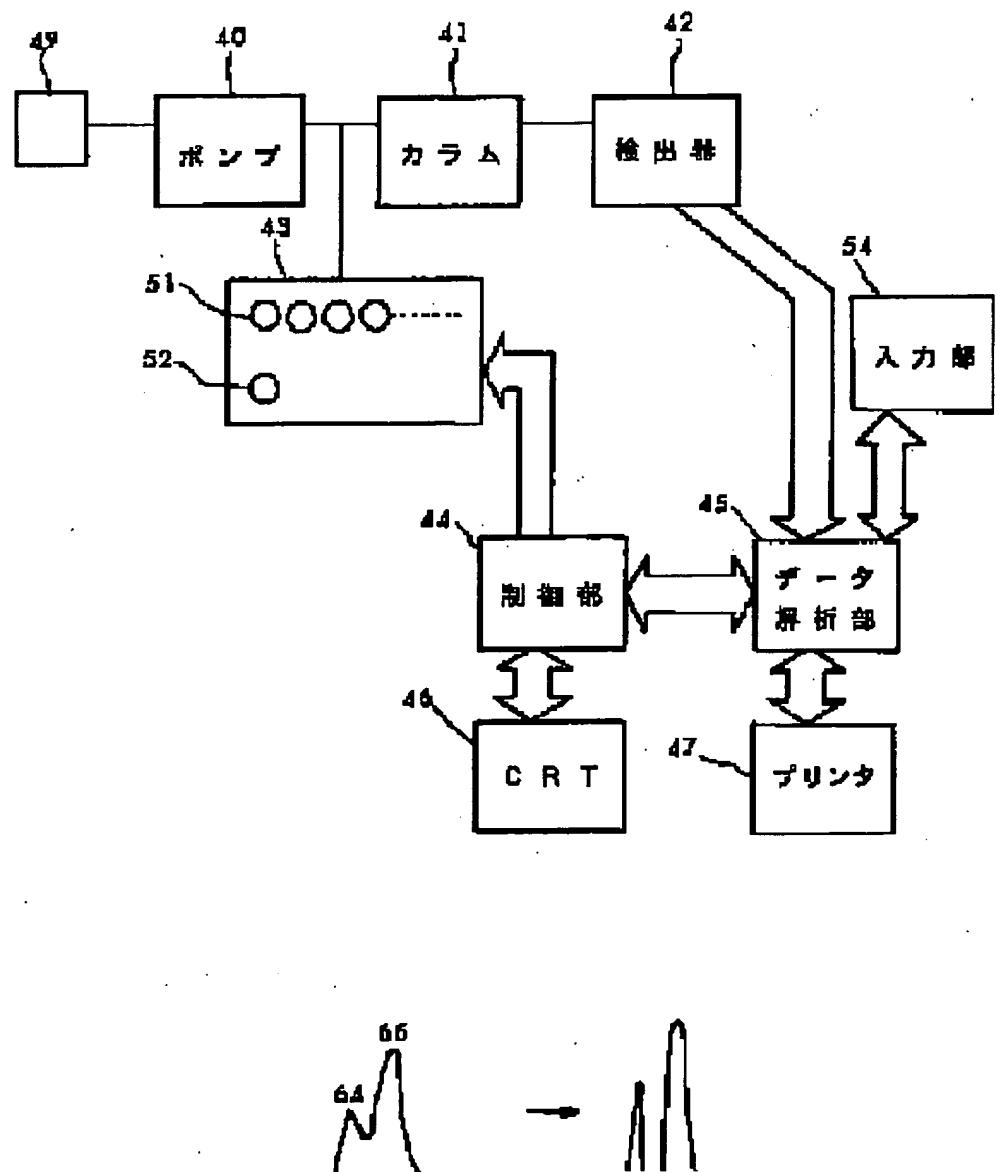
(74) Representative:

(54) CHROMATOGRAM ANALYSIS METHOD, CHROMATOGRAPH DEVICE AND DATA PROCESSOR USED FOR THEM

(57) Abstract:

PURPOSE: To exactly find a peak area and contrive the improvement of analysis precision by deconvolution-processing detection peak waveforms by means of a spreading function, correcting waveform strain of chromatogram, sharpening the overlapped peak waveforms and separating them.

CONSTITUTION: A standard sample 52 wherein a non-holding component is added is infected, a peak which is larger than size which appears at the beginning time of chromatogram is automatically identified as a non-holding wave peak or time designation is performed from an input part 54, a mouse non- holding wave peak is extracted and designated from the chromatogram shown in CRT 46, its area is normalized and a normalization function (spreading function) is found. Next, the start point and the end point of a time of the overlapped peak 64, 64 desired to be measured are set, convolution processing is performed in the time interval by means of



the normalization function, integration intended for the peak waveform after sharpened processing is conducted, and measurement and calculation are performed to output to CRT 46 or a printer 46.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO



(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-103959

(43)公開日 平成7年(1995)4月21日

(51)Int.Cl.⁶

G 0 1 N 30/86

識別記号 庁内整理番号

B 8310-2J

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数23 OL (全16頁)

(21)出願番号	特願平5-249335	(71)出願人	000005108 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地
(22)出願日	平成5年(1993)10月5日	(72)発明者	伊藤 正人 茨城県勝田市大字市毛882番地 株式会社 日立製作所計測器事業部内
		(72)発明者	出口 喜三郎 茨城県勝田市堀口字長久保832番地2 日 立計測エンジニアリング株式会社内
		(72)発明者	三浦 順吉 茨城県勝田市大字市毛882番地 株式会社 日立製作所計測器事業部内
		(74)代理人	弁理士 高橋 明夫 (外1名)

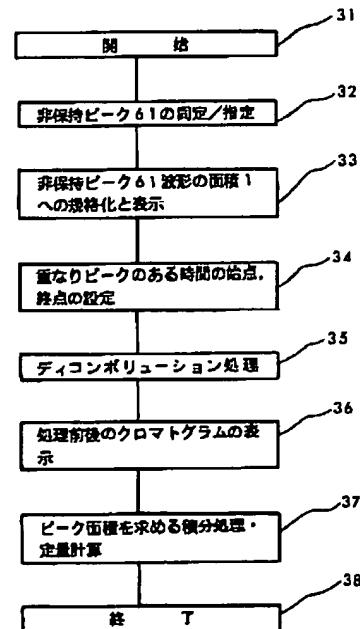
(54)【発明の名称】 クロマトグラム解析方法およびクロマトグラフ装置およびこれらに用いられるデータ処理装置

(57)【要約】

【目的】 クロマトグラムの波形歪を補正し、重なりのピーク波形をシャープにすることにより分離・独立させ、ピーク面積をより正確に求め、定量分析の精度が高いクロマトグラム解析方法を提供することができる。

【構成】 非保持ピーク61を同定する工程32と、非保持ピーク61の面積を1に規格化する工程33と、オペレータが正確に定量したい重なりピークのある時間の始点と終点を設定する工程34と、前記規格化関数を用いて、設定された区間内でディコンポリューション処理を行なう工程35と、処理前後のクロマトグラムを表示する工程36と、シャープになったピーク波形を積分し、定量計算をする工程37とから構成することを特徴とする。

図 5



【特許請求の範囲】

【請求項1】 分析試料から分離カラムにより検出ピーク波形を得る段階と、前記検出ピーク波形中の重なりピークを分離する段階と、前記分離されたピーク波形を出力させる段階とをふくむクロマトグラム解析方法において、

前記重なりピークを分離する段階は、前記検出ピーク波形から拡がり関数 $h(t)$ を求める方法と、次いで前記関数 $h(t)$ を用いて前記検出ピーク波形をディコンボリューション処理する方法とからなることを特徴とするクロマトグラム解析方法。

【請求項2】 拡がり関数 $h(t)$ を求める方法は、基準を設定し推定手法によることを特徴とする請求項1記載のクロマトグラム解析方法。

【請求項3】 基準は、重なりピーク波形を分離・独立させる点とすることを特徴とする請求項2記載のいずれかのクロマトグラム解析方法。

【請求項4】 拡がり関数 $h(t)$ を求める方法は、注入試料、移動相、固定相の少なくともいずれか一つを制御し保持しないピークを求め、そのピーク波形に基づき拡がり関数 $h(t)$ を求めることを特徴とする請求項1記載のクロマトグラム解析方法。

【請求項5】 拡がり関数 $h(t)$ を求める方法は、注入試料、移動相、固定相の少なくともいずれか一つを作成し保持しないピークを求め、そのピーク波形に基づき拡がり関数 $h(t)$ を求めることを特徴とする請求項1記載のクロマトグラム解析方法。

【請求項6】 拡がり関数 $h(t)$ を求める方法は、当該拡がり関数 $h(t)$ を特徴づけるパラメータを入力し、次いで、当該拡がり関数 $h(t)$ を出力することを特徴とする請求項1記載のクロマトグラム解析方法。

【請求項7】 入力されるパラメータは、拡がり関数 $h(t)$ を決定するための参考・制限となる情報であることを特徴とする請求項6記載のクロマトグラム解析方法。

【請求項8】 参考・制限となる情報は、解析初期値、推定されるピークに関する個数、大きさ、幅、保持時間のいずれかであることを特徴とする請求項7記載のクロマトグラム解析方法。

【請求項9】 拡がり関数 $h(t)$ は、標準試料中の非保持成分の規格化関数であることを特徴とする請求項1ないし8記載のいずれかのクロマトグラム解析方法。

【請求項10】 拡がり関数 $h(t)$ は、非保持成分を分離カラムに注入し、その検出ピーク波形より求められることを特徴とする請求項4または5記載のいずれかのクロマトグラム解析方法。

【請求項11】 分析試料から分離カラムにより検出ピーク波形を得る段階と、前記検出ピーク波形中の重なりピークを分離する段階と、前記分離されたピーク波形を出力させる段階とをふくむクロマトグラム解析方法にお

いて、

前記検出ピーク波形中の重なりピークを分離する段階と、前記分離されたピーク波形を出力させる段階とは、重なりピーク波形を分離・独立させるようにディコンボリューション処理をするときに用いた拡がり関数 $h(t)$ により、前記分離・独立された各波形にリコンボリューション処理をし、リコンボリューション処理後の各波形を前記最初の重なりピーク波形と重ね描きすることを特徴とするクロマトグラム解析方法。

10 【請求項12】 混合物試料を分離カラムにより検出ピーク波形を得る手段と、前記検出ピーク波形中の重なりピークを分離する手段と、前記分離されたピーク波形を出力させる手段とをふくむクロマトグラフ装置において、

前記重なりピークを分離する手段は、前記検出ピーク波形から拡がり関数 $h(t)$ を求める解析部と、前記関数 $h(t)$ を用いて検出ピーク波形をディコンボリューション処理する処理部とを具備したことを特徴とするクロマトグラフ装置。

20 【請求項13】 解析部は、基準を設定し推定手法により拡がり関数 $h(t)$ を求めるように構成したこと特徴とする請求項12記載のクロマトグラフ装置。

【請求項14】 基準は、重なりピーク波形を分離・独立させる点に設定されたことを特徴とする請求項13記載のいずれかのクロマトグラフ装置。

【請求項15】 解析部は、注入試料、移動相、固定相の少なくともいずれか一つを制御し保持しないピークを求め、そのピーク波形に基づき拡がり関数 $h(t)$ を求められるように構成したことを特徴とする請求項12記載のクロマトグラフ装置。

【請求項16】 解析部は、注入試料、移動相、固定相の少なくともいずれか一つを作成し保持しないピークを求め、そのピーク波形に基づき拡がり関数 $h(t)$ を求められるように構成したことを特徴とする請求項12記載のクロマトグラフ装置。

【請求項17】 解析部は、当該拡がり関数 $h(t)$ を特徴づけるパラメータを入力する入力部と、当該拡がり関数 $h(t)$ を出力する出力部とを具備することを特徴とする請求項12記載のクロマトグラフ装置。

40 【請求項18】 入力部は、拡がり関数 $h(t)$ を決定するための参考・制限となる情報を入力できるように構成されていることを特徴とする請求項17記載のクロマトグラフ装置。

【請求項19】 入力される情報は、解析初期値、推定されるピークに関する個数、大きさ、幅、保持時間のいずれかあることを特徴とする請求項18記載のクロマトグラフ装置。

【請求項20】 拡がり関数 $h(t)$ は、標準試料中の非保持成分の規格化関数であることを特徴とする請求項12ないし19記載のいずれかのクロマトグラフ装置。

【請求項21】 拡がり関数 $h(t)$ は、非保持成分を分離カラムに注入し、その検出ピーク波形より求められるように構成したことを特徴とする請求項15または6記載のいずれかクロマトグラフ装置。

【請求項22】 混合物試料を分離カラムにより検出ピーク波形を得る手段と、前記検出ピーク波形中の重なりピークを分離する手段と、前記分離されたピーク波形を出力させる手段とをふくむクロマトグラフ装置において、

前記検出ピーク波形中の重なりピークを分離する手段と、前記分離されたピーク波形を出力させる手段とは、重なりピーク波形を分離・独立させるようにディコンボリューション処理をするときに用いた拡がり関数 $h(t)$ により、前記分離・独立された各波形にリコンボリューション処理をし、リコンボリューション処理後の各波形を前記最初の重なりピーク波形と重ね描きできるように構成したことを特徴とするクロマトグラフ装置。

【請求項23】 A/D変換部と、メモリ部と、制御部と、インターフェース部と、出力機器等からなるクマトグラム解析方法およびクロマトグラフ装置に用いられるデータ処理装置において、前記クマトグラムの検出ピーク波形から拡がりを表わす関数 $h(t)$ を算出・出力し、検出ピーク波形および前記関数 $h(t)$ を用いて前記検出ピーク波形をディコンボリューション処理し、ディコンボリューション処理後のクマトグラムを出力することを特徴とするクマトグラム解析方法およびクロマトグラフ装置に用いられるデータ処理装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、液体クロマトグラフィ、ガスクロマトグラフィ等のクロマトグラフィ技術に係り、特にクロマトグラム解析方法（以下、解析方法という）およびそれに使用されるクロマトグラフ装置、前記解析方法およびクロマトグラフ装置に用いられるデータ処理装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 従来の技術の説明に先立ち、技術用語の定義をする。本出願においては、コンボリューションとは、二つの関数 $x(t)$ 、 $y(t)$ に対するたたみ込み積分として定義され、一般に計測機器からの出力波形は、入力波形と装置関数（電気回路ではインパルス応答、分光器ではスリット関数）とのコンボリューションとなる。ディコンボリューションとは、コンボリューションの逆演算として定義される。具体的にはコンボリューションであらわされている積分方程式を解くことに相当する。リコンボリューションとは、装置関数、すなわち拡がりを表わす関数 $h(t)$ を用いてディコンボリューションした波形に対し、ふたたびその関数 $h(t)$ を用いてコンボリューションすることをいう。

【0003】 さて、従来から一般に計測機器からの出力波形データは、その計測機器の動特性、すなわち装置関数の影響によって歪をうける。クロマトグラフ装置においても同様であり、装置関数、すなわち拡がりを表わす関数 $h(t)$ によりクロマトグラム上に歪を生じたり、クロマトグラム上にピークの重なりが生じる。このような場合、それぞれクロマトグラムのピーク面積を正確に求めることが困難であった。

10 【0004】 従来、上記歪をうけた場合は、ディコンボリューション処理により、上記ピークの重なりに対しては、通常曲線適合法を基本とした合成分離法を用い、データ処理的に分解し、定量することが提案されている。これに関する一般的な解決手法については、南茂夫編著「科学計測のための波形データ処理」、CQ出版株式会社刊、（1986）の記載技術がある。また、多くの改善技術が、例えば特開昭62-17465号公報記載の技術、特開昭63-151851号公報記載の技術等が提案されている。

20 【0005】 前記特開昭62-17465号公報記載の技術は、立上り側の半値幅が、立上り地点から終了点までの距離の所定倍になるガウシアンにて近似するものであるが、クロマトグラムが重なりピーク波形の場合、必ずしもこのような近似で置換しうる場合は少ない。この技術は、記憶容量を減らすことには有効であるけれども、ピーク波形が重なった場合、ピーク面積を正確に求めることについては、必ずしも有効ではないという欠点があった。

30 【0006】 前記特開昭63-151851号公報記載の技術においては、従来、重なりピークの分割をいわゆる垂直分割、スキミング分割処理をしていたものを二つのガウシアンに分割して近似し、最小二乗法と呼ばれる手法にてディコンボリューション処理を行なっているが、物理的に意味のある解が得られないという欠点があった。

40 【0007】 また、U.S. PAT 4807148号、U.S. PAT 4941101号公報等記載の技術においては、ディコンボリューション処理において数値解析の手法が用いられ、Janssonの方法、ヤコビ法、ガウス-ザイデル法等があり、演算時間、記憶容量の点で有利となっていたが、解の不連続点の拡大等に欠点があった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 上記従来の種々のディコンボリューション処理は、クロマトグラムが歪をうけた場合のディコンボリューション処理、クロマトグラムの重なりピーク波形を生じた場合に対する合成分離については、それぞれ個々に解決法を提供するが、歪をうけることによる重なりピーク波形を生じた場合には、歪をうけたことを考慮し、重なり波形を分離するところまで50 は群しく検討され、対処されていなかった。

【0009】また、上記従来におけるクロマトグラムピーク波形の重なりに対する合成分離法は、次のような問題がある。

1. ガウシアン等の非線形関数を仮定した場合、その関数を選択する妥当性が疑問である。
2. UVスペクトル等のマルチチャンネル情報を導入する場合、フォトダイオードアレイ検出器等の高価な検出器が必要となる。
3. ピーク分解においては最小自乗法を用いるため、解が得られるまでに長い計算時間を要し、また物理的に意味のある解が得られない場合もある。

【0010】本発明は、上記従来技術の問題点を解決するためになされたもので、クロマトグラムの波形の歪を補正し、重なりのピーク波形をシャープにすることにより分離を向上させ、ピーク面積をより正確に求め、定量分析の精度が改良されたでクロマトグラム解析方法を提供することを第一の目的とする。また、本発明の第二の目的は、前記クロマトグラム解析方法を用いたクロマトグラフ装置を提供することを第二の目的とする。本発明の第三の目的は、前記クロマトグラム解析方法および前記クロマトグラフ装置用のデータ処理装置を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】上記第一の目的を達成するために、クロマトグラム解析方法に係る本発明の構成は、分析試料を分離カラムにより検出ピーク波形を得る段階と、前記検出ピーク波形中の重なりピークを分離する段階と、前記分離されたピーク波形を出力させる段階とをふくむクロマトグラム解析方法において、前記重なりピークを分離する段階は、前記検出ピーク波形から拡がり関数 $h(t)$ を求める方法と、次いで前記関数 $h(t)$ を用いて前記検出ピーク波形をディコンポリューション処理する方法とからなることを特徴とする。

【0012】拡がり関数 $h(t)$ を求める方法は、基準を設定し推定手法によることを特徴とする。設定された基準は、重なりピーク波形を分離・独立させる点とすることを特徴とする。拡がり関数 $h(t)$ を求める方法は、注入試料、移動相、固定相の少なくともいずれか一つを制御し、保持しないピークを求め、そのピーク波形に基づき拡がり関数 $h(t)$ を求めることを特徴とする。拡がり関数 $h(t)$ を求める方法は、注入試料、移動相、固定相の少なくともいずれか一つを作成し、保持しないピークを求め、そのピーク波形に基づき拡がり関数 $h(t)$ を求められるように構成したことを特徴とするものである。解析部は、注入試料、移動相、固定相の少なくともいずれか一つを作成し、保持しないピークを求め、そのピーク波形に基づき拡がり関数 $h(t)$ を求められるように構成したことを特徴とするものである。解析部は、当該拡がり関数 $h(t)$ を特徴づけるパラメータを入力する入力部と、当該拡がり関数 $h(t)$ を出力する出力部とを具備したことを特徴とするものである。

【0013】入力されるパラメータは、拡がり関数 $h(t)$ を決定するための参考・制限となる情報であることを特徴とする。参考・制限となる情報は、解析初期

値、推定されるピークに関する個数、大きさ、幅、保持時間のいずれかであることを特徴とする。拡がり関数 $h(t)$ は、標準試料中の非保持成分の規格化関数であることを特徴とする。拡がり関数 $h(t)$ は、非保持成分を分離カラムに注入し、その検出ピーク波形より求めることを特徴とする。

【0014】クロマトグラム解析方法に係る本発明の他の構成は、前記検出ピーク波形中の重なりピークを分離する段階と、前記分離されたピーク波形を出力させる段階とは、重なりピーク波形を分離・独立させるようにディコンポリューション処理をするときに用いた拡がり関数 $h(t)$ により、前記分離・独立された各波形にリコンポリューション処理をし、リコンポリューション処理後の各波形を前記最初の重なりピーク波形と重ね描きすることを特徴とする。

【0015】上記第二の目的を達成するために、クロマトグラフ装置に係る本発明の構成は、混合物試料を分離カラムにより検出ピーク波形を得る手段と、前記検出ピーク波形中の重なりピークを分離する手段と、前記分離されたピーク波形を出力させる手段とをふくむクロマトグラフ装置において、前記重なりピークを分離する手段は、前記検出ピーク波形から拡がり関数 $h(t)$ を求める解析部と、前記関数 $h(t)$ を用いて検出ピーク波形をディコンポリューション処理する処理部とを具備したことを特徴とするものである。

【0016】解析部は、基準を設定し推定手法により拡がり関数 $h(t)$ を求めるように構成したことを特徴とするものである。基準は、重なりピーク波形を分離・独立させる点に設定されたことを特徴とするものである。

【0017】入力部は、拡がり関数 $h(t)$ を決定するための参考・制限となる情報を入力できるように構成されていることを特徴とするものである。入力される参考・制限となる情報は、解析初期値、推定されるピークに関する個数、大きさ、幅、保持時間のいずれかであることを特徴とするものである。拡がり関数 $h(t)$ は、標準試料中の非保持成分の規格化関数であることを特徴とするものである。拡がり関数 $h(t)$ は、非保持成分を分離カラムに注入し、その検出ピーク波形より求められることを特徴とするものである。

【0018】クロマトグラフ装置に係る本発明の他の構成は、前記検出ピーク波形中の重なりピークを分離する手段と、前記分離されたピーク波形を出力させる手段とは、重なりピーク波形を分離・独立させるようにディコンポリューション処理をするときに用いた拡がり関数 $h(t)$ により、前記分離・独立された各波形にリコンボリューション処理をし、リコンボリューション処理後の各波形を前記最初の重なりピーク波形と重ね描きすることを特徴とする。

【0019】上記第三の目的を達成するために、クロマトグラム解析方法およびクロマトグラフ装置用のデータ処理装置に係る本発明の構成は、A/D変換部と、メモリ部と、制御部と、インターフェース部と、出力機器等からなる。クロマトグラム解析方法およびクロマトグラフ装置に用いられるデータ処理装置において、前記クロマトグラムの検出ピーク波形から拡がりを表す関数 $h(t)$ を算出・出力し、検出ピーク波形および前記関数 $h(t)$ を用いて前記検出ピーク波形をディコンボリューション処理し、ディコンボリューション処理後のクロマトグラムを出力することを特徴とするものである。

【0020】より詳しく説明すると、クロマトグラムのピークは、種々の原因により拡がっている。例えば配管や検出器のフローセル等の流路を試料が流れることにより、試料ゾーンが拡がる。これはカラム外の拡がりと呼ばれている。このカラム外の拡がりに代表される拡がりによる寄与は、オリジナルのピーク波形にコンボリューション演算され、検出波形に現われる。つまり、拡がり関数が既知であれば、検出波形をディコンボリューション演算することによりオリジナルのピーク波形を計算することができる。

【0021】拡がり関数 $h(t)$ を決定する手法はいろいろなものが考えられる。手法を大きく2つに分類すると、実験的に検出データから求める方法と波形を特徴づけるいくつかのパラメータを持つ解析数学的な $h(t)$ を仮定する方法がある。前者は $h(t)$ が既知の方法、後者は $h(t)$ が未知の方法と考えることができる。

【0022】前記 $h(t)$ を測定から求める方法として、例えばカラム外の拡がりを得るために、カラムをジョイントと交換し、試料を注入し、検出器で測定された波形を $h(t)$ とみなす方法がある。試料内の成分の種類に依存しないようなカラム内の拡がりも付加するなら、保持しない試料を注入し、そのピーク波形を $h(t)$ とみなすことができる。

【0023】保持しないピークを得る方法には、他に溶離液に溶出能力の極めて強い溶媒を使用すること、カラム充填剤に官能基を修飾しないものを作成し保持しないようにする等が考えられる。また、標準試料の中に保持しない成分を添加し、非保持ピークを標準試料のクロマトグラムから得る方法も有効である。

【0024】 $h(t)$ が未知の場合、次のような点を前提条件し、ピーク幅の一部分に相当する拡がり関数 $h(t)$ をディコンボリューション処理し、よりシャープなピークを持つ処理クロマトグラムからピーク面積をもとに正確に定量することができる。

【0025】その前提条件とは、検出されるピーク波形はオリジナルにはデルタ関数的あるいは非常にシャープな長方形的な濃度分布関数に対して、拡がり関数をコンボリューション演算したものであると考えられる。ここで拡がり関数は、ほぼガウシアンであり、それが若干テーリングのあるいはリーディング的に修正された波形をしている。つまり、拡がり関数自体もガウシアンに対してテーリングカリーディングの修正関数がコンボリューション演算されていると考えられる。

【0026】また、ガウシアンには2つのガウシアンをコンボリューション演算すると、それもまたガウシアンであるという加成性がある。以上により拡がり関数の一部分を構成しているガウシアンをディコンボリューション演算することにより、よりシャープなオリジナルな波形に近づいたピークを計算することができるようになる。

【0027】

【作用】上記各技術的手段の働きは次のとおりである。第一の発明の構成によれば、検出クロマトグラムから既知の $h(t)$ またはガウシアンを合理的に選択し、ディコンボリューション演算することにより、検出クロマトグラムの重なりピークよりシャープなピークを持つクロマトグラムに分離・独立させ、分離・独立した各ピークを積分した時、正確にピーク面積が求められ、正確な定量をすることができる。上記ディコンボリューション演算は、例えば非線形関数の最小自乗法と異なり、短い計算時間により物理的に意味のある解を必ず得ることができる。

【0028】また、上記ディコンボリューション演算は、重なりピークが分離・独立されたときに、そのクロマトグラムを観察し、その演算の妥当性を判断しているが、熟練が必要となる。そこで、ディコンボリューション演算に用いた拡がり関数 $h(t)$ を用い、独立した各ピークにリコンボリューション演算を施し、最初の重なりピークを構成している各ピークを再現することができる。このリコンボリューション演算後の各ピークと最初の重なりピークとを重ね描きすることにより上記ディコンボリューション演算の妥当性を正確に判断することができる。

【0029】第二の発明の構成によれば、例えばフォトダイオードアレイ検出器等の高価な検出器を省略し、簡単な構成により第一の発明のクロマトグラム解析方法を実施することができる。第三の発明の構成によれば、第一の発明のクロマトグラム解析方法および第二の発明のクロマトグラム解析装置のデータを適確、かつ、経済的

に処理することができる。

【0030】

【実施例】

【実施例 1】以下、本発明に基づく一実施例を図1ないし図11を参照して説明する。図1は、本発明における一実施例に係るクロマトグラム解析方法(以下、解析方法という)に用いるマイクロボアHPLCシステムの構成を示すブロック図、図2は、図1の解析方法におけるクロマトグラムを示す線図、図3は、図1の解析方法におけるクロマトグラムの拡がりメカニズムの略示説明図、図4は、図1の解析方法におけるディコンポリューション演算説明図、図5は、図1の解析方法に係る処理工程のフローチャート、図6は、図1の解析方法におけるクロマトグラムの重ね描きプロット図である。

【0031】また、図7は、図1の解析方法によるアミノ酸分析のクロマトグラムを示す線図、図8は、図1の解析方法によるグリコヘモグロビン分析のクロマトグラムを示す線図、図9は、図1の解析方法において拡がり関数が未知の場合の処理フローチャート、図10は、図1の解析方法におけるカテコールアミン分析のクロマトグラムを示す線図、図11は、図1の解析方法におけるリコンポリューション演算による重ね描き説明図である。

【0032】第一の発明に係るクロマトグラム解析方法を実施するため、マイクロボアHPLCシステムを使用する。図1は、マイクロボアHPLCシステムの全体構成を示している。図1において、40はポンプ、41はカラム、42は検出器、43はサンプラー、44は制御部、45はデータ解析部、46はCRT表示部、47はプリンタ、49は溶離液、51は未知試料、52は標準試料、54は入力部である。

【0033】本システムを構成する各部は、データ解析部45(【実施例 2】において後述)を除き、通常のクロマトグラム解析方法を用いられるものである。したがって、詳細な説明は煩瑣となるので省略し、簡単に説明する。

【0034】前記マイクロボアHPLCシステムでは、*

$$y(t) = \int_{-\infty}^{\infty} h(t') \cdot r(t-t') dt'$$

$$= h(t) * r(t)$$

上式において、時刻tにおける検出波形をy(t)、サンプル注入時のオリジナルな長方形波形をr(t)、拡がり関数をh(t)とある。上式は、検出波形y(t)は、オリジナルな長方形波形r(t)と、拡がり関数h(t)とのコンポリューションであることを示している。

*カラム外の拡がりが分離に大きく影響し、無視できない。制御部44の命令によりポンプ40は溶離液49を送液する。可動ニードル弁を有するサンプラー43は、未知試料51あるいは標準試料52をカラム41への流路に注入する。試料は、溶離液49とともにカラム41に送りこまれ、含有成分が分離展開され、検出器42で検出される。

【0035】前記検出されたクロマトグラムは、データ解析部45に記憶される。図2は、検出されたクロマトグラムである。前記標準試料52には非保持成分を添加しているため、非保持ピーク61としてそれが検出される。次に溶出されるピーク62は標準試料の一成分であり、ピーク61と異なりカラム内に保持され、ピーク幅も若干広くなっている。

【0036】図3を参照し、ピーク波形が形成されるメカニズムについて説明する。図3は、図1の一実施例に係る解析方法におけるクロマトグラムの拡がりのメカニズムの説明図である。図3において、図中、図1の符号と同一符号は同等部分であるので詳細な説明は省略する。上段(a)図は、試料流路を示すブロック図であり、下段(b)図は、上段(a)図の試料流路における試料の濃度を示している。

【0037】単一成分を含む試料は、サンプラー43により流路内に注入される。この時の流路内での試料濃度Cの空間分布図は、流れの方向をxとすれば、長方形状の分布線図71である。この長方形状の分布線図71がカラム41を通過すると拡大する。前記カラム41を通過した段階は、分布線図72のようなガウシアンの形状である。

【0038】さらに、検出器42において、前記ガウシアンの濃度分布を検出する時には流路配管や検出器のフローセル等により濃度分布が拡げられ、分布線図73のように分布前図72よりも広い分布形状になっている。

【0039】これを数式で記述すると、(1)式のようなモデルで表現できる。

【数1】

… (1)

【0040】ピークの形状の拡がりについては、上記説明でよいが、リテンションタイムについても考慮すると、もう一つDifracのデルタ関数がコンポリューション演算されていると考えられる。これを(2)式に示す。

【数2】

$$\begin{aligned}
 EMG(t) &= \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma\tau} \int_0^t e^{-\frac{(t-t_R-t')^2}{2\sigma^2}} e^{-\frac{t'}{\tau}} dt' \\
 &= \int_{-\infty}^{\infty} \left[\frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(t-t')-t_R)^2}{2\sigma^2}} Q(t-t') \right] \\
 &\quad \cdot \left[\frac{1}{\tau} e^{-\frac{t'}{\tau}} Q(t') \right] dt' \\
 &= G(t-t_R) * Q(t) * m(t)
 \end{aligned}$$

t は常に正なので

$$= \delta(t-t_R) * G(t) * m(t) \quad \dots (2)$$

ここで

$$Q(t) = \begin{cases} 0 & (t < 0) \\ 1 & (t \geq 0) \end{cases} \text{である。}$$

【0041】上式において、 $EMG(t)$ は、Exponentially Modified Gaussian であり、 σ 、 τ 、 t_R は、 $EMG(t)$ のパラメータ、 $\delta(t)$ はデルタ関数、 $m(t)$ は修正関数である。拡がりのメカニズムについては、“DYNAMICS OF CHROMATOGRAPHY”, J. C. Giddings著, Marcel Dekker刊, New York, 1965 に詳しく説明されているのでそれ譲る。

【0042】拡がり関数 $h(t)$ は、カラム内での拡がりとカラム外での拡がりの両方からの影響により形成される。つまりカラム内での拡がり関数とカラム外での拡がり関数のコンポリューションである。

【0043】図2における非保持ピーク61に着目し、図3を参照し説明すると、注入時は長方形波形71だったものが、カラム41を通過し、ガウシアン波形72に抜けられ、カラム外の拡がりの影響を受け、波形73となり、ピーク61として検出されていることになる。

【0044】一方、保持ピーク62も同様なメカニズムで抜けられ、ピークが形成されているのであるが、前記カラム41内に保持されているために、若干広めのピーク幅に抜けられている。すなわち、ピーク62に影響する拡がり関数は、ピーク61と共通の拡がり関数とそれ以外の余剰の拡がり関数とのコンポリューションになっている。

【0045】この場合、ピーク62の拡がり関数からビ 50 と、図5に示す検出波形処理のフローチャートとを参照

ーク61の拡がり関数の影響を取り除き、余剰の拡がり関数だけを得ることができる。この処理をディコンポリューション処理と呼ぶ。

【0046】前記ディコンポリューション演算は、図2に示すピーク64とピーク65との重なりピーク 30 に対して効果がある。図4を参照して説明する。図4は、図2に示す重なりピークに対しディコンポリューション演算を説明している。

【0047】前記ピーク64波形と前記ピーク65波形とに対して前記ピーク61波形の拡がり関数をディコンポリューション演算すると、図4に示すような分離された余剰分のピークが得られ、より正確にそれぞれのピークの面積が計算できる。実際は、ピーク波形61を面積1に規格化した規格化関数をディコンポリューション演算に利用する。規格化はピーク面積を保存するために行われる。

【0048】厳密に言えば、この規格化関数は、(式)1の注入時の長方形関数 $r(t)$ とピーク波形61に影響する拡がり関数 $h(t)$ の規格化されたコンポリューションである。実際には、ピーク波形61以外のピークにも長方形関数の影響があるため、ピーク61波形の規格化関数でディコンポリューション演算しても問題にはならないわけである。

【0049】以上の図4のディコンポリューション手順を図1のマイクロボアHPLCシステムのブロック図

して説明する。まず、非保持成分を添加した標準試料52が注入され、工程31にて波形処理が開始される。

【0050】次に、工程32で非保持ピーク61を同定する。これはクロマトグラムの最初の時刻に現われるある大きさ以上のピークとして自動的に同定するか、またはオペレータが入力部54から時刻指定を行うか、CRT46に表示しているクロマトグラムからマウスを使用し、ピーク61をピックアップすることで指定することができる。

【0051】工程33において、非保持ピーク61の面積を1に規格化する。この時、CRT46に規格化関数を表示することもできる。工程34において、オペレータが正確に定量したい重なりピークのある時間の始点と終点を設定する。前記CRT46には、図4の左図のように、この部分だけを拡大したクロマトグラムを表示することもできる。ここでオペレータはクロマトグラムの全ての時間を設定することも可能である。

【0052】工程35において規格化関数を用いて、設定された時間区間内でディコンポリューション処理を行なう。工程36において処理前後のクロマトグラムをCRT46に図4の右側と左側とのように表示する。また、図6に示す如く、プリンタ47に重ね描きしたクロマトグラムをプロットすることもできる。

【0053】工程37において、シャープになった図4の右側のピークを対象に積分を実行し、定量計算を行なう。この処理後のクロマトグラムでもまだピークが重なっている場合には、従来通りの垂直分割等で面積計算する。ここでガウシアン、EMG等の非線形関数で最小自乗法により面積分割することもできる。ここでCRT46かプリンタ47に定量値を出力する。工程38において処理を終了する。

【0054】ディコンポリューション処理をする拡がり関数を標準試料52中の非保持成分のピーク波形の規格化関数で代用したが、この方法の他にも拡がり関数を得ることができる。標準試料に添加する代わりに、予め拡がり関数を求めるために非保持成分だけ注入し、ピーク波形を得ることができる。

【0055】また、逆相クロマトグラフィーならメタノール、アセトニトリル、THF、クロロホルム等有機溶媒100%の溶離液を流し、保持の弱い成分を注入し、非保持ピークを得ることができる。イオン交換クロマトグラフィーでは、例えばアミノ酸分析計の場合、pHの高い再生液を流し、保持の弱いホスホセリン等を注入し、そのピーク波形を得ることができる。

【0056】また、カラム充填剤を操作し、非保持ピークを得ることもできる。イオン交換クロマトグラフィーなら、イオン交換基の修飾しない担体だけの充填剤を作成し、非保持ピークを得ることもできる。

【0057】ポストカラム反応LCの実施例としてアミノ酸分析計をあげる。このシステムもカラム外の拡がり

を無視できない。カラム外の拡がりは、カラムをジョイントに交換し、非保持ピークの波形を拡がり関数として見積ることができる。

【0058】図7に示す如く検出されたクロマトグラムにおいては、スレオニン(Thr)とセリン(Ser)の重なり部分が14%であるのに対し、ディコンポリューション処理されたクロマトグラムでは4%と1/3以下に向上した。この処理クロマトグラムは、ポストカラム反応LCにおいて、カラムの直後で検出できたとした場合のクロマトグラムに相当している。

【0059】拡がり関数の共通部分の除去例として、3、3分間処理のグリコヘモグロビン分析計をあげる。拡がり関数を図8の左側に示すHbFのピーク波形から見積ることができる。これはHbA1cのピーク幅が、リテンションタイムの順序を考慮し、HbFの幅よりも若干広いと考えられるためである。

【0060】図8の左側の検出クロマトグラムより孤立したピークであるHbFの波形を規格化し、拡がり関数を得る。その規格化関数を用いて、不安定型と安定型とのHbA1cの重なりピークをディコンポリューション処理すれば、図8の右側に示すような分離の向上したクロマトグラムが求められるわけである。

【0061】ディコンポリューション処理は、この場合処理クロマトグラムを直接表示する必要はないが、定量精度を向上するためには、一般的なHPLCであるグリコヘモグロビン分析計においても非常に有効な手法である。

【0062】次にディコンポリューション演算を正しく行なうために演算前に利用すべき処理について説明する。図2に示されているノイズ67やドリフト68がディコンポリューション演算を妨害する。これらをそのままディコンポリューション処理すると、擬似的なピークとして増幅されたり、ディコンポリューション処理されるべきピークが正しく処理されないといった弊害が起こる。

【0063】まず、ノイズ除去処理としては一般的に検出クロマトグラムのデータ点をいくつか足し算して低減する方法が採られる。この他に平滑化の方法や公知の高周波成分を除去する方法も利用できる。

【0064】ドリフト除去処理としては一般的にピーク間の谷から谷を直線で結んだり、強制的に水平に直線を描き、検出クロマトグラムからベースラインを引き算する方法が採られる。この他に公知の低周波成分を除去する方法、微積分を利用し低次の多項式成分を除去する方法、微分の特徴点からベースラインを探索する方法、ニューラルネットワークを利用する方法等がある。

【0065】ここまで拡がり関数を測定データより求めてきたが、拡がり関数が未知である場合でも、ガウシアンをディコンポリュート演算することができる。前述したように検出クロマトグラムのピーク波形は、(1)

式で示されるように、拡がり関数 $h(t)$ と長方形波形の $r(t)$ とのコンポリューションで表わせる。

【0066】この拡がり関数 $h(t)$ は、前述の "DYNAMICICS OF CHROMATOGRAPHY" J. C. Giddings著により、カラム内の拡がりがどのような物理学的、化学的相互作用に起因しているかも、カラム外の拡がりが無視できないくらい大きくとも、

$$h(t) = G(t) * m(t)$$

*も、ガウシアン様の形状をしている。

【0067】 $h(t)$ がリーディングのかまたはテーリング的にガウシアンから多少歪んでいたとしても、下記の(3)式のようにガウシアン $G(t)$ と修正関数 $m(t)$ とのコンポリューションとして記述できる。

【数3】

$$\dots (3)$$

$$G(t) \text{ は, } \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{t^2}{2\sigma^2}} = G(t, \sigma) \text{ で表われる。}$$

【0068】上式において、ガウシアンを $G(t)$ 、修正関数を $m(t)$ 、 σ は標準偏差である。例として、 $h(t)$ が EMG(t) により表わせるテーリングピークであるなら、前述の(2)式のように解析数学的に修正※

$$y(t) = \delta(t - t_{R1}) * G(t, \sigma_1) * m_1(t) + \delta(t - t_{R2}) * G(t, \sigma_2) * m_2(t) \dots (4)$$

ここで、 σ_1, σ_2 はそれぞれ標準偏差である。

【0070】ガウシアンは、上記の如く、加成性があるため、2つのガウシアンのコンポリューションに分解で★

$$G(t, \sigma_a) = G(t, \sigma_b) * G(t, \sigma_c) \dots (5)$$

$$\sigma_a^2 = \sigma_b^2 + \sigma_c^2$$

$\sigma_a, \sigma_b, \sigma_c$ はそれぞれの標準偏差である。

※関数が求められる。

【0069】また、重なりピークは、(4)式のように表わせる。

【数4】

$$\dots (4)$$

【0071】つまり、(4)式で表わされている2つのピーク波形はガウシアンを用いて、ディコンポリューション演算ができる。この時そのガウシアンは、2つのピークの持つ標準偏差 σ_1 と σ_2 よりも小さな標準偏差 σ_0 を持つ幅の狭い波形でなければならない。

【0072】こうして、検出された重なりピークよりも幅の狭いピークを得ることができる。最終的には、 $y \star$

$$y(t) = G(t, \sigma_0) * \left[\delta(t - t_{R1}) * G\left(t, \sqrt{\sigma_1^2 - \sigma_0^2}\right) * m_1(t) + \delta(t - t_{R2}) * G\left(t, \sqrt{\sigma_2^2 - \sigma_0^2}\right) * m_2(t) \right]$$

$$\dots (6)$$

ここで、 $\sigma_0 \leq \sigma_1, \sigma_0 \leq \sigma_2$ でなければならない。

上式の [] 内のように、 σ_1, σ_2 よりピーク幅の狭いピークが得られる。より詳しくいえば、注入時の長方形波形はこの修正関数によりコンポリューション演算されている。

【0074】この拡がり関数 $h(t)$ が未知の場合の処理を図9を参照して説明する。工程71で処理を開始する。工程72で検出クロマトグラムからノイズ・ドリフトを除去し、ディコンポリューション処理の準備をする。工程73でディコンポリューション処理を手動で行

☆(t) をガウシアン $G(t, \sigma_0)$ によりディコンポリューション演算すると、クロマトグラムは、幅のより狭いガウシアンともとのまま修正関数とのコンポリューションにより表わすことができるわけである。

【0073】

【数6】

なうか、自動で行なうのかを入力する。

【0075】自動の場合、工程81で、検出クロマトグラムのピーク幅を全体的に見て、最小の幅よりもやや小さな標準偏差を持つガウシアンを拡がり関数として設定する。これは面積1に規格化されている。ここで、リテンションタイムの短いピークと長いピークでピーク幅が2倍以上異なる場合は、時間を分割してディコンポリューション演算することもできる。

【0076】ここで自動的にピーク幅を見つけ出すため

にフーリエ変換を利用することもできる。工程76でディコンボリューション処理を実行する。工程77で処理クロマトグラムが発散していないか、負の下限値を下回っていないか判定する。また不分離ピークがピーク間の谷を形成しているか等を判定する。

【0077】ここで判定が合格となれば、工程79へ進む。判定が不合格の場合、もう一度工程81へ戻り、判定を参考し標準偏差を加減し、ディコンボリューション処理を行なう。判定合格の場合、工程79で処理クロマトグラムの表示、定量結果の表示等を行なう。工程80で終了する。

【0078】手動の場合、工程74で入力操作を行なう。一般的にはディコンボリューション処理するガウシアンの標準偏差を入力する。他に処理区間の始・終点の入力もできる。また特定の重なりピークの分離を向上するために、ガウシアンの最適な標準偏差を探索することもできる。

【0079】この場合、標準偏差の初期値、推定されるピークの個数、大きさ、幅、保持時間等を参考値として入力することもできる。また制限値として、ピーク個数は3個までとか、重なりピークの幅が0.2分以上0.4分以下のように入力することもできる。

【0080】工程75で工程74にて入力された情報を演算し、ディコンボリューション処理の設定値を求め、判定の基準値を算出する。工程76でディコンボリューション処理を実行する。工程77で判定を行なう。不合格の場合、その理由を工程78で表示し、工程74で再入力を促す。合格の場合、工程79で処理クロマトグラムと定量結果を表示する。工程80で終了する。

【0081】カテコールアミン分析計により得られた生の10分間のクロマトグラムを図10の上段(a)に示す。これは、血漿や尿のような生体試料の分析例である。生体試料を分析すると数多くのピークがしばしば現われる。これを適切なガウシアンでディコンボリューション処理すると、中段(b)のようなクロマトグラムが得られる。各ピークがベースラインまで完全に分離している。

【0082】しかしこれをそのまま表示しても、処理クロマトグラムの意味するところは理解困難である。むしろ、これを下段の(c)に示した公知の表示法にしても差し支えない。また、定量値のみを出力するだけで、ディコンボリューション処理をオペレーターに意識させないのがよいと考えられる。

【0083】以上、第一の発明の一実施例について説明したが、本発明は、上記実施例に限定されるものではなく、種々の変形例が考えられる。本発明に係るクロマトグラム解析方法の他の一方法を説明する。図11は、第一の発明に係る解析方法におけるディコンボリューション、リコンボリューションによる重ね描きの説明したものである。

【0084】図11(1)は、検出されたオリジナルの波形である。このオリジナルの波形にディコンボリューション処理し、各波形ピークを分離・独立させる。この状態を図11(2)に示す。分離・独立させた波形ピークをそれぞれディコンボリューションしたときと同じ拡がり関数h(t)によりリコンボリューションする。リコンボリューション演算された波形を検出されたオリジナルの波形に重ね描きをする。図11(3)は、この状態を示したものである。

【0085】【実施例2】本発明に係るクロマトグラフ解析装置の一実施例を説明する。図12は本発明に係る他の一実施例であるクロマトグラフ解析装置の構成を示すブロック図である。第二の発明に係るクロマトグラフ解析装置の全体構成については、【実施例1】において、図1のマイクロボアHPLCシステムについて説明したので、煩瑣となるので再度の説明を省略し、データ解析部45のみを説明する。

【0086】前記データ解析部45は、ノイズ・ドリフト除去機構と、拡がり関数解析機構と、ディコンボリューション演算機構と、定量計算機構と、判定機構とから構成されている。図中、図示されてないが、A/D変換器、記憶装置、インタフェース部等も備えていることはいうまでもない。前記構成の内、ノイズ・ドリフト除去機構、定量計算機構、判定機構は、公知の技術であるが順序としてあわせて説明をする。なお、前記各機構部は、バスによって接続されている。

【0087】前記ノイズ・ドリフト除去機構は、平滑化機構と、ベースライン算出機構信号と、高速フーリエ変換機構と、ニューラル・ネットワーク機構と、微分・積分機構と、ファジイ推論機構とを備えており、前記平滑化機構は、検出器43からのクロマトグラムの測定データ群を移動平均法、Savitzky-Golay法、Kawata-Minami法、周波数領域法のいずれかにより滑らかな曲線にフィットし、前記ベースライン算出機構は、適切なアルゴリズムによりベースラインを決定する。

【0088】前記高速フーリエ変換機構は、高周波成分であるノイズおよび低周波成分であるベースライン変動をそれぞれ周波数分布に基づき除去する。また、前記ニューラル・ネットワーク機構は、ドリフト形状を予め学習しておき、測定データから所定の結合定数に従い、ドリフトを除去する。

【0089】前記微分・積分機構は、微分・積分により低次の多項式で表現されるベースライン成分を除去する。この整理された測定データ点群をファジイ推論機構が所定の結合定数に従い平滑化する。このようにして検出器43からのクロマトグラムのノイズおよびドリフトは除去される。

【0090】前記拡がり関数解析機構は、Gaussi an発生機構と、面積1規格化機構と、検出ピーク波形

設定機構とを備え、解析数学的拡がり関数の場合は、前記 Gaussian 発生機構により Gaussian を発生する。実測的拡がり関数の場合は、前記面積 1 規格化機構により実測されたピーク波形を規格化し、前記検出ピーク波形設定機構により前記規格化された実測波形を拡がり関数としている。このようにして実測的ないし解析数学的拡がり関数を発生する。

【0091】前記ディコンポリューション演算機構は、時間区間設定機構と、拡がり関数設定機構と、ディコンポリューション処理機構とを備え、前記時間区間設定機構は、ディコンポリューション処理する区間を設定し、前記拡がり関数設定機構は、上記の発生させた実測的ないし解析数学的拡がり関数から拡がり関数を設定する。前記ディコンポリューション処理機構は、設定されたディコンポリューション処理する区間の重なり波形を前記拡がり関数によりディコンポリューション処理し、重なり波形を分離・独立させる。

【0092】前記定量計算機構は、積分機構を備え、前記積分機構は、前記分離・独立させたピーク波形の面積をそれぞれ算出する。このようにしてピーク面積ないし高さに基づき定量を計算する。前記定量結果は、CRT 46、プリンター部 47 に出力される。

【0093】各種の判定を行う判定機構は、ディコンポリューション処理の成功を判定するために利用する判別式の値を計算する判別式計算機構、ディコンポリューション処理するために利用する Gaussian を探索するときに制限となる値を算出する制限値算出機構と、所定の結合係数に従いその最適な Gaussian を探索する拡がり関数探索機構を備えし、上記各処理段階において、各機構が所定の働きが可能となるようサポートしている。

【0094】図 12 における制御部 44、データ解析部 45、CRT 部 46、プリンター部 47 等の機能を一体化して、A/D 変換部と、メモリ部と、制御部と、インタフェース部と、出力機器とからなり、クロマトグラムの検出ピーク波形から拡がりを表わす関数 $h(t)$ を算出し、検出ピーク波形および前記関数 $h(t)$ を用いて前記検出ピーク波形をディコンポリューション処理し、ディコンポリューション処理後のクロマトグラムを出力することを特徴とするクロマトグラム解析方法とクロマトグラフ装置とに用いられるデータ処理装置を構成しても差し支ええない。

【0095】

【発明の効果】以上詳細に説明したように、本発明の構成によれば、第一に、クロマトグラムの波形の歪を補正し、重なりのピーク波形をシャープにすることにより分離を向上させ、ピーク面積をより正確に求め、定量分析

の精度が改良されたでクロマトグラム解析方法を提供することができる。また、第二に、前記クロマトグラム解析方法の実施に用いられるクロマトグラフ装置を提供することができる。さらに、第三に、前記クロマトグラム解析方法および前記クロマトグラフ装置に用いられるデータ処理装置を提供することできる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明における一実施例に係る解析方法に用いるマイクロボア HPLC システムの構成を示すブロック図である。

【図 2】図 1 の解析方法におけるクロマトグラムを示す線図である。

【図 3】図 1 の解析方法におけるクロマトグラムの拡がりメカニズムの略示説明図である。

【図 4】図 1 の解析方法におけるクロマトグラムの重なりピークに対するディコンポリューション演算説明図である。

【図 5】図 1 の解析方法に係る処理工程のフローチャートである。

【図 6】図 1 の解析方法におけるクロマトグラムの重ね書きプロット図である。

【図 7】図 1 の解析方法によるアミノ酸分析のクロマトグラムを示す線図である。

【図 8】図 1 の解析方法によるグリコヘモグロビン分析のクロマトグラムを示す線図である。

【図 9】図 1 の解析方法において拡がり関数が未知の場合の処理フローチャートである。

【図 10】図 1 の解析方法におけるカテコールアミン分析のクロマトグラムを示す線図である。

【図 11】図 1 の解析方法におけるリコンポリューション演算による重ね書き説明図である。

【図 12】本発明に係る他の一実施例に係るクロマトグラフ解析装置の構成を示すブロック図である。

【符号の説明】

4 0 …ポンプ

4 1 …カラム

4 2 …検出器

4 3 …サンプラ

4 4 …制御部

4 5 …データ解析部

4 6 …CRT 表示部

4 7 …プリンタ

4 9 …溶離液

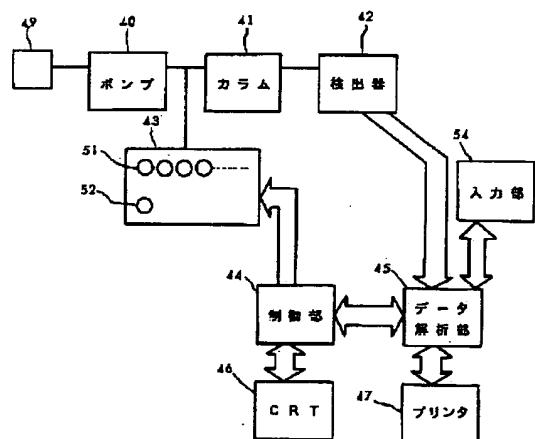
5 1 …未知試料

5 2 …標準試料

5 4 …入力部

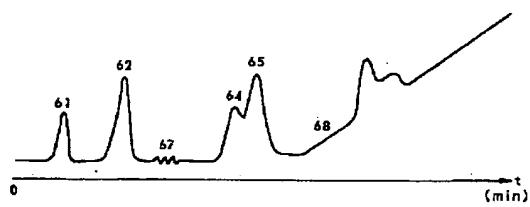
【図1】

図 1



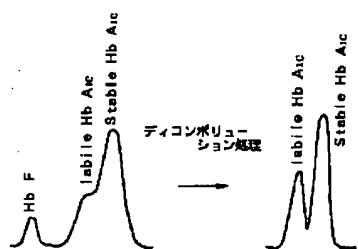
【図2】

図 2



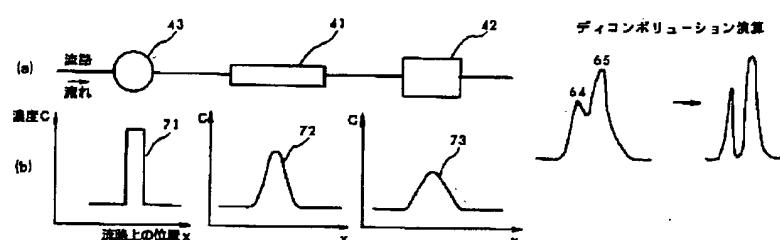
【図8】

図 8



【図3】

図 3

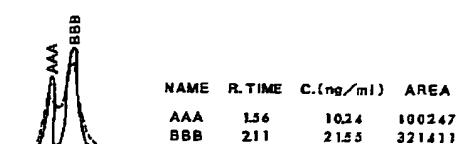


【図4】

図 4

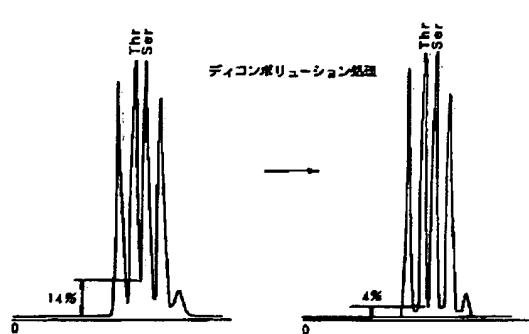
【図6】

図 6



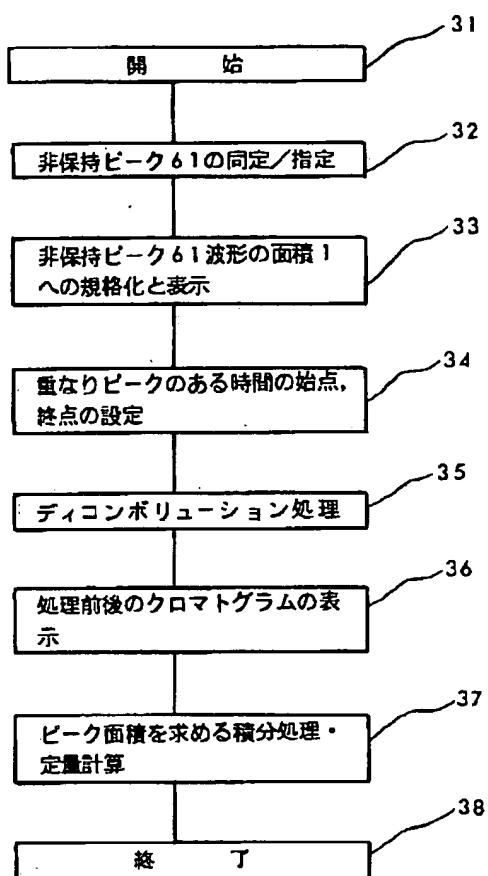
【図7】

図 7



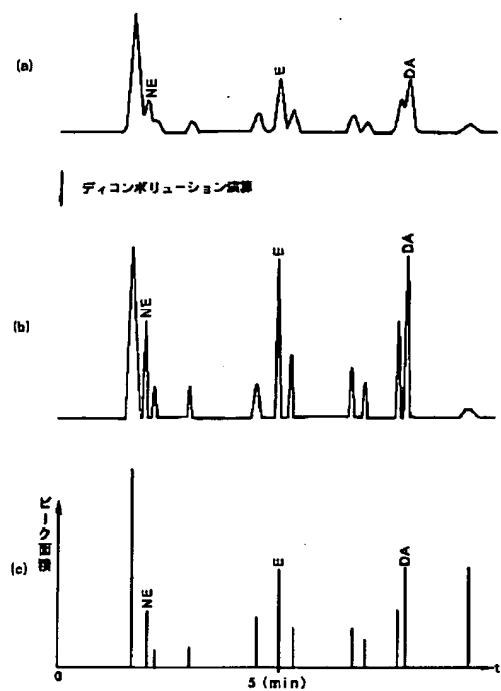
【図5】

図 5



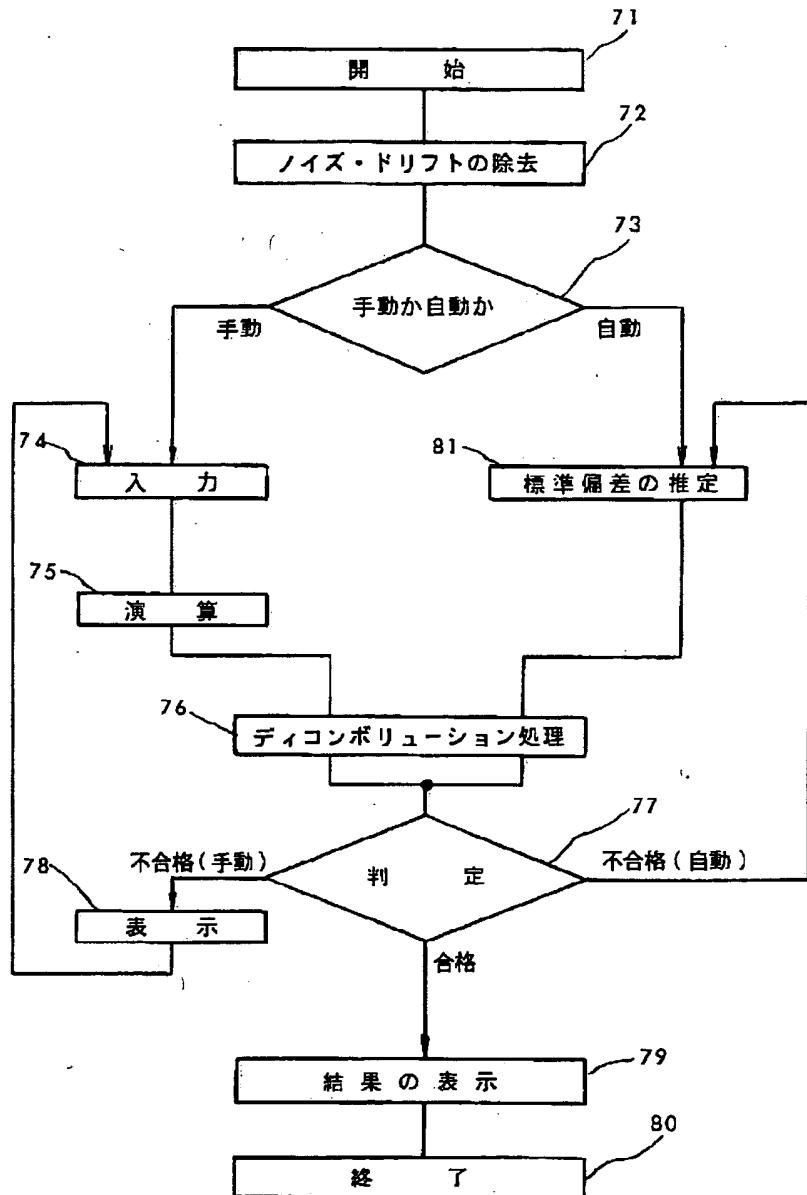
【図10】

図 10



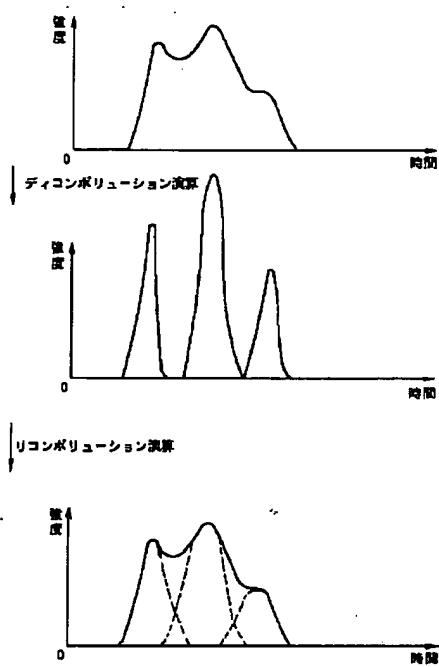
【図9】

図 9



【図11】

図11



【図12】

図 12

